


**PRODUCTION OF GAMMA-DELTA T-CELL AND IMMUNOTHERAPEUTIC AGENT****Patent number:** JP10295368**Publication date:** 1998-11-10**Inventor:** YAMAGUCHI TOMOHIRO; FUJIMIYA YOSHIKI;  
EBINA TAKUSABUROU; SUZUKI YOICHI; KATAKURA  
RYUICHI; YOKOYAMA JUNKICHI; YOSHIMOTO  
TAKASHI**Applicant:** HITACHI CHEM CO LTD;; SUMITOMO FORESTRY CO  
LTD;; EBINA TAKUSABUROU;; SUZUKI YOICHI;;  
KATAKURA RYUICHI;; YOKOYAMA JUNKICHI;;  
YOSHIMOTO TAKASHI**Classification:****- International:** C12N5/06; A61K35/14**- european:****Application number:** JP19970104966 19970422**Priority number(s):****Also published as:** JP10295368 (A)**Abstract of JP10295368**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To readily and efficiently produce a  $\gamma$ - $\delta$  T-cell excellent in treatment effect and useful as an immunotherapeutic agent, etc., in a high yield, by removing a CD16-positive cell from a lymphocyte and culturing the resultant lymphocyte.

**SOLUTION:** This method for producing  $\gamma$ - $\delta$  T-cell comprises carrying out each step comprising the first culturing step for removing a CD16-positive cell from a lymphocyte, and culturing the resultant lymphocyte in the presence of an immobilized anti-CD3 antibody and a T-cell growth factor, and the second culturing step for culturing the resultant material in the absence of the immobilized anti-CD3 antibody and in the presence of the T-cell growth factor to provide the objective  $\gamma$ - $\delta$  T-cell. An immunotherapeutic agent useful for adoptive immunotherapy, which is one of therapeutic method of cancer, etc., is preferably prepared by using the  $\gamma$ - $\delta$  T-cell.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平 10-295368

(43)公開日 平成10年(1998)11月10日

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00 E
A 6 1 K 35/14	A D U.	A 6 1 K 35/14 A D U C

審査請求 未請求 請求項の数3

O L

(全8頁)

(21)出願番号 特願平9-104966

(22)出願日 平成9年(1997)4月22日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年10月23日 日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集会記録第26巻」に発表

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社  
東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(71)出願人 000183428

住友林業株式会社  
大阪府大阪市中央区北浜4丁目7番28号

(71)出願人 597056707

海老名 卓三郎  
宮城県仙台市青葉区広瀬町二丁目12番地

(71)出願人 597056718

鈴木 洋一  
宮城県仙台市宮城野区原町五丁目9番6号

(74)代理人 弁理士 若林 邦彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ガンマー・デルタ T細胞の製造法及び免疫治療剤

(57)【要約】

【課題】 採血直後の新鮮末梢血中に含まれる比較的少量のリンパ球から、ガンマー・デルタ T細胞を効率よく増殖し、製造する方法及び癌等の治療法の1つである養子免疫療法に有用な免疫治療剤を提供する。

【解決手段】 リンパ球から C D 1 6 陽性細胞を除いた後、培養することを特徴とするガンマー・デルタ T細胞の製造法及びこの製造法により得られるガンマー・デルタ T細胞を含有してなる免疫治療剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リンパ球から CD16 陽性細胞を除いた後、培養することを特徴とするガンマー・デルタ T 細胞の製造法。

【請求項 2】 培養を、固相化した抗 CD3 抗体及び T 細胞増殖因子の存在下に培養する第 1 期培養工程、固相化した抗 CD3 抗体の不存在下かつ T 細胞増殖因子の存在下に培養する第 2 期培養工程の各工程を含む方法で行う請求項 1 記載のガンマー・デルタ T 細胞の製造法。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載の製造法により得られるガンマー・デルタ T 細胞を含有してなる免疫治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ガンマー・デルタ T 細胞の製造法及び免疫治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 ガンマー・デルタ T 細胞は、T 細胞受容体ガンマー・デルタ鎖を有し、ほとんどが CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>分化抗原（なお、+は陽性、-は陰性を意味する。以下同様。）を発現する T 細胞である。ガンマー・デルタ T 細胞は、末梢血中には全リンパ球の 3～5% 程度の少数が含まれるにすぎない。末梢血中の T リンパ球の大多数は、従来「ヘルパー/インデューサー T 細胞」といわれる CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>抗原を有する細胞、「キラー/サプレッサー T 細胞」といわれる CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>抗原を有する細胞であり、T 細胞受容体アルファ・ベータ鎖を発現しているアルファ・ベータ T 細胞である。

【0003】 ガンマー・デルタ T 細胞の機能の一つは、強い腫瘍細胞障害性を有することである。普通、アルファ・ベータ T 細胞は、標的腫瘍細胞の標的抗原と組織適合抗原（HLA）を同時に認識して攻撃する（組織適合抗原拘束性）。従って、何らかの理由により組織適合性抗原を発現していない標的腫瘍細胞に対しては攻撃しない。一方、ガンマー・デルタ T 細胞は、組織適合性抗原に関係なく標的腫瘍細胞の標的抗原を認識して攻撃する（組織適合抗原非拘束性）。しかも腫瘍浸潤性が強い。従って、ガンマー・デルタ T 細胞は標的腫瘍細胞の選択範囲が広く、免疫療法には有効な細胞であるといえる。このことから、ガンマー・デルタ T 細胞を出来るだけ高濃度にして癌患者に投与すれば、強い抗腫瘍効果が期待できる。

【0004】 また、ガンマー・デルタ T 細胞の機能の一つは、細菌感染等に対する感染防御に働いていることである。ガンマー・デルタ T 細胞の抗原認識機構は未だ不明な部分が多いが、抗原提示細胞からの提示または細菌表面の抗原を直接認識する可能性が考えられる。細菌などが侵入すると、ガンマー・デルタ T 細胞がその抗原を認識し、早期に増殖し、感染防御に当たる。この場

合は、特に感染部位に局所に存在するガンマー・デルタ T 細胞が主役となる。これらの事実から、本発明により得られたガンマー・デルタ T 細胞は、感染防御、感染症治療にも有用であることが類推される。

【0005】 しかしながら、ここで問題になるのは、前述した通りガンマー・デルタ T 細胞は末梢血中に極少数しか含まれていないことである。必要十分な数のガンマー・デルタ T 細胞を得るには、大量の血液を必要とするが、この方法では、まず患者自身の肉体的負担が大きく、また、たとえ大量の血液が得られたとしても、T 細胞以外の例えば赤血球、単核球、血小板などの細胞が多数含まれるため、ガンマー・デルタ T 細胞を単離するのは大変困難である。

【0006】 ガンマ・デルタ T 細胞を増殖する方法として、Jared L. Kleinら（Journal of Immunology 156巻、2754-2760頁、1996年）では、Herpesvirus samiriに感染したヒト臍帯血由来単核球から、IL-2 依存性に増殖するガンマー・デルタ T 細胞株を樹立し、これを実験に使用している。しかし、この細胞の表面抗原は CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>であり、この細胞は健康人に存在するガンマー・デルタ T 細胞とは明らかに性格が異なるものである。従って、免疫療法のために癌患者に投与するなどの臨床応用を考えた場合、この方法を使用することはできない。

【0007】 その他、実験的に少量の末梢血からリンパ球を分離し、各種抗原又はサイトカインなどの刺激物質で刺激し、その後クローニングを行ってガンマー・デルタ T 細胞を単離する方法がある。しかし、この方法は、免疫療法のために癌患者等に投与するなどの臨床応用を考えた場合、フィーダー細胞等のコンタミネーションなどの質的な問題があり、また量的に必要な細胞を得るのは不可能に近い。以上から明らかなように、現在まで、健康人に正常に存在するガンマ・デルタ T 細胞を、十分に効率的に十分な量迄増殖し、単離できる方法はないのが現状である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 請求項 1 及び 2 記載の発明は、採血直後の新鮮末梢血中に含まれる比較的少量のリンパ球から、ガンマー・デルタ T 細胞を効率よく増殖し、製造する方法を提供するものである。請求項 3 記載の発明は、癌等の治療法の 1 つである養子免疫療法に有用な免疫治療剤を提供するものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明は、リンパ球から CD16 陽性細胞を除いた後、培養することを特徴とするガンマー・デルタ T 細胞の製造法に関する。また本発明は、前記培養を、固相化した抗 CD3 抗体及び T 細胞増殖因子の存在下に培養する第 1 期培養工程、固相化した抗 CD3 抗体の不存在下かつ T 細胞増殖因子の存在下に培養する第 2 期培養工程の各工程を含む方法で行う前

記のガンマー・デルタT細胞の製造法に関する。さらに本発明は、前記の製造法により得られるガンマー・デルタT細胞を含有してなる免疫治療剤に関する。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】本発明で増殖するガンマー・デルタT細胞とは、少なくともCD3<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>の表面抗原を有し、かつT細胞受容体ガンマー・デルタ鎖を発現している細胞である。本発明の製造法における特徴は、リンパ球から、CD16陽性細胞を除いて、培養を開始する点にある。ここで除かれるCD16陽性細胞としては、CD16<sup>+</sup>ナチュラルキラー(NK)細胞、少量存在するCD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>細胞などがある。CD16<sup>+</sup>NK細胞は、表面抗原にCD16分子を発現している細胞で、標的細胞の組織適合抗原に拘束されることなく標的細胞を攻撃する能力を有する細胞であるが、内皮細胞の間を通り抜け患部局所に到達することができないため、血管外の標的細胞には有効ではない。これに対して、血管外の標的細胞にも到達するガンマー・デルタT細胞の方が効果が高いといえる。

【0011】ここで、リンパ球を増殖した後にのみガンマー・デルタT細胞を単離すると、抗CD4抗体を用いたCD4陽性細胞の除去、抗CD8抗体を用いたCD8陽性細胞の除去及び抗CD16抗体を用いたCD16陽性細胞の除去の3段階の除去操作が必要となつて、除去操作が長時間に亘るため、せっかく増殖したガンマー・デルタT細胞の活性等にダメージを与え、しかも、除去工程において一部のガンマー・デルタT細胞が無駄に除去されてしまう。

【0012】CD16陽性細胞以外の細胞は、ガンマー・デルタT細胞の増殖に何らかの形で関与していると思われるため、増殖前に除かないことが好ましい。その他の細胞を除いたり、ガンマー・デルタT細胞のみを最初に単離して培養すると、ガンマー・デルタT細胞が単独では増殖の能力が大変弱いため、数日間で増殖を停止する傾向にある。なお、ガンマー・デルタT細胞の増殖に関係のない細胞は除いてもよい。

【0013】本発明の製造法において、出発物として用いられるリンパ球としては、末梢血リンパ球、上皮性リンパ球、腫瘍内浸潤リンパ球、癌性腹水胸水浸潤リンパ球など生体に存在するあらゆるリンパ球が挙げられ、特に制限はされないが、末梢血リンパ球、特に採血直後の新鮮末梢血リンパ球が、採血患者への身体的負担、リンパ球分離の簡便さ、分離後のリンパ球の生存率の良さ等の点で好ましい。用いる細胞の数としては $1 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$ 個程度であるのが、量的に問題なく培養できるので好ましく、血液量では、血中の細胞密度により個人差があるが10~20mlが採血時の患者への負担も軽いので好ましい。

【0014】採血直後の20mlの新鮮末梢血中には普通約 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 個のリンパ球が含まれるが、そ

のうち、CD16<sup>+</sup>NK細胞等のCD16陽性細胞は数パーセント含まれている。CD16陽性細胞の除去方法としては、リンパ球を含む液と抗CD16抗体を結合させた固相担体とを接触させ、CD16陽性細胞を結合させた後、固相を分離する方法が、簡便でかつ残りの細胞に対するダメージが少ないので好ましい。固相担体としては、マイクロタイタープレート、プラスチックフラスコ、ポリスチレンビーズ等の高分子ビーズ、磁気ビーズなどが挙げられるが、操作が簡便で効率よくCD16陽性細胞を除去できるので、磁気ビーズを使うことが好ましい。

【0015】抗CD16抗体としては、抗ヒトCD16ポリクローナル抗体、抗ヒトCD16モノクローナル抗体を用いることができるが、抗ヒトCD16モノクローナル抗体が好ましい。抗ヒトCD16モノクローナル抗体としては、ラット、マウス、ヒツジなどの動物種由来のものがある。なお、これらは市販品を使用してもよい。

【0016】磁気ビーズを用いる場合、抗CD16抗体を固相化する手法としては、磁気ビーズに上記抗CD16抗体を直接結合させる方法と、抗CD16抗体に対して反応性を有する別の抗体が結合した抗体結合磁気ビーズと上記抗CD16抗体を結合させる方法がある。後者の方法において、「抗CD16抗体に対して反応性を有する抗体」としては、固相化しようとする抗CD16抗体の由来動物種に対する抗体が好ましい。例えば、抗ヒトCD16モノクローナル抗体がマウス由来の場合は、抗マウスIgG結合磁気ビーズを用いることができる。このような、抗体結合磁気ビーズは市販されているので、それらを使用することができる。

【0017】抗CD16抗体と、この抗体に反応性を有する抗体が結合した抗体結合磁気ビーズとは、両者を混合し、0~4℃で1~24時間静置し反応させることが好ましい。その混合量は、用いる磁気ビーズの種類により異なるが、ビーズ $10^6$ 個に対して抗体量として1~100μgが好ましい。前記操作の終了後、洗浄することが好ましく、その条件としては、冷却したリン酸緩衝液で3回以上洗浄することが好ましい。

【0018】得られた抗CD16抗体を結合させた固相担体は、ついでリンパ球を含む液と混合する。CD16陽性細胞を反応させるには、1~2時間0~4℃で静置することが好ましい。この操作で、CD16陽性細胞が抗CD16抗体と結合する。固相担体が磁気ビーズの場合、反応終了後、磁石により磁気ビーズを吸着させると、CD16陽性細胞を除去することができる。

【0019】ついでCD16陽性細胞が除去されたリンパ球を培養する。培養には、各種の培養液を使用することができる。培養液は、T細胞の増殖に必要な栄養素を含有するものであれば制限はなく、血清等の生物由来の培養液、平衡塩類溶液にアミノ酸、ビタミン、核酸塩基

などを加え、さらに必要に応じてウシ胎児血清やウシ血清アルブミンを加えた合成培地などが使用でき、RPMI-1640、AIM-V、DMEM、IMDM等が具体的に好ましいものとして挙げられ、RPMI-1640が特に好ましい。これらの培地は市販品を用いることができる。

【0020】また、培養液中にT細胞増殖因子を添加するのが好ましい。T細胞増殖因子としては、インターロイキン2 (IL-2)、フィトヘマグルチニン (PHA) などを用いることが好ましく、IL-2を用いることが特に好ましい。さらに培養は、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で行うことが好ましく、CO<sub>2</sub>濃度は、1~10%、特に5%が好ましい。培養の温度は30~40℃が好ましく、37℃が特に好ましい。培養液の交換又は添加は、培養液の劣化及びT細胞増殖因子の活性の低下を防ぐために、1~7日に一回行うことが好ましい。

【0021】本発明において、培養は、固相化した抗CD3抗体及びT細胞増殖因子の存在下に培養する第1期培養工程、固相化した抗CD3抗体の不存在下かつT細胞増殖因子の存在下に培養する第2期培養工程の各工程を含む方法で行うのが、活性の高いガンマー・デルタT細胞を大量に増殖させることができるので好ましい。T細胞増殖因子としては、IL-2を用いることが特に好ましい。

【0022】ここでCD3とは、Tリンパ球の細胞表面に存在し、T細胞受容体 (TCR) と共に標的抗原を認識する際に重要な分子である。CD3分子を介して刺激情報が細胞内に伝達されることにより、T細胞は増殖を開始する。同様な現象が、CD3分子に対する特異的抗体 (抗CD3抗体) の刺激により起こる。Tリンパ球の刺激に用いる抗CD3抗体は、精製したCD3分子を用いて動物又は細胞に産生させることもできるが、安定性、コスト等に優れた市販品を用いることもできる。特に抗CD3抗体としては、OKT-3 (オルソ社製) が好ましい。抗CD3抗体の固相化には、抗体を滅菌したリン酸緩衝液で1~10 µg/mlの濃度に希釈して用いるのが好ましい。抗体を固相化する器具としては、プラスチック製の滅菌済み細胞培養フラスコ等が好ましい。その大きさは特に制限はない。固相化方法としては、前記抗CD3抗体の希釈液を固相化する器具に加え、2~24時間、4~37℃で静置する方法が好ましい。固相化後、使用時まで冷蔵庫 (4℃) で保存することが好ましい。使用時には、液を除去し、好ましくは4℃のリン酸緩衝液等で洗浄する。

【0023】培養の際に、IL-2はリンパ球の刺激に十分であることから10~2000 U/mlの濃度で用いるのが好ましい。IL-2は市販されているものを用いることができる。IL-2は、水、生理食塩液、リン酸緩衝液、RPMI-1640、AIM-V、DMEM、IMDM等の一般に広く用いられる細胞培養液等に溶解し

て使用することができる。一度溶解したものは、活性の低下を防ぐため、冷蔵保存することが好ましい。

【0024】この方法では、CD16陽性細胞を除去したリンパ球は、IL-2を含む培養液に浮遊させ、抗CD3抗体を固相化した培養容器に入れ培養を開始するのが好ましい。ここで用いる培養液としては、リンパ球の培養に適したものであれば特に制限されないが、RPMI-1640が好ましく、正常ヒト血清を加えたものが増殖効果に優れ好ましい。培養は、一般的な細胞培養の方法に従うことができる。例えば、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で行うことができる。CO<sub>2</sub>濃度は1~10%、特に5%が好ましく、温度は30~40℃、特に37℃が好ましい。この培養は、日数に制限はないが、抗CD3抗体の刺激情報が細胞に伝達されることが前提となるため、2~20日行うことが好ましく、3~7日行うことがより好ましい。この培養期間内には、顕微鏡下で細胞の状態を観察し、適宜細胞数を計測し、必要に応じてIL-2を含む培養液を添加するのが好ましい。培養液の添加量は、添加前の培養中の液量に対して0.1~5倍程度が好ましい。その添加割合は、培養液の劣化及びIL-2活性の低下を防ぐために、1~7日に一回行うことが好ましい。

【0025】本発明においては、上述の培養を第1期培養工程の後、固相化した抗CD3抗体の不存在下かつIL-2の存在下に培養する第2期培養工程を設けることが、リンパ球を大量に増殖・維持できるので好ましい。抗CD3抗体を固相化した培養容器で長期間培養を行うと、リンパ球の増殖が抑制されることがある。第2期培養に用いる培養容器としては、細胞培養用のプラスチック製フラスコ、CO<sub>2</sub>ガス透過性のガス・バーミアブル・バッグ等を使用することができるが、この工程ではリンパ球が急速に大量に増殖してくるため、2~4日毎に培養器の数を増やしていくことが好ましい。細胞数の目安としては、 $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$  個/mlになるように培養液の追加又は培養器の数の増加を行っていくことが好ましい。

【0026】以上の方法で増殖したリンパ球細胞は、ほとんどがCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞及びCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>のガンマー・デルタT細胞となる。ここからガンマー・デルタT細胞を単離する場合には、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞及びCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞を除去すればよい。除去の方法としては、抗CD16抗体の代わりに抗CD4抗体及び/又は抗CD8抗体を用いること以外は、CD16陽性細胞の除去において説明した方法と同様の方法を用いることができる。具体的には、抗CD4モノクローナル抗体及び/又は抗CD8モノクローナル抗体を結合させた磁気ビーズを混合して反応させ、ついで磁石を用いてこれらのビーズを除去すると、効率よく必要なガンマー・デルタT細胞を単離することが出来るので好ましい。

【0027】以上の操作によって、ガンマー・デルタT細胞の純度を上げて単離することができ、例えば、95%以上の高純度まで精製して単離することができる。さらに高純度にガンマー・デルタT細胞の精製度をあげることが必要な場合には、この時点で再度少量存在しうるCD16陽性細胞を除去することもできる。除去する方法は、先に説明した方法と同様の方法を用いることができる。この場合には、CD16陽性細胞の含有率が低いため、無駄なく容易にCD16陽性細胞を除去することができる。

【0028】以上の方法で得られるガンマー・デルタT細胞は、IL-2で刺激された場合、一般に増殖活性の指標として用いられる<sup>3</sup>Hを標識したthymidineの細胞内への取り込みを増加させ、また、末梢血を採取したと同じドナー由来の腫瘍細胞（自己腫瘍細胞）に対して細胞障害活性（cytotoxicity）を示す。従って、癌、各種感染症等の治療に有用な養子免疫療法に用いる免疫治療剤の有効成分とすることができる。また、研究用試薬として、種々の研究用途に用いることができる。

【0029】免疫治療剤の投与量は、1回あたり、本発明により得られる細胞の量で $10^6 \sim 10^{12}$ 個の細胞が好ましい。投与形態としては、注射剤、点滴剤等の液体が好ましく、前記細胞をヒト血清アルブミンを0.01~5%となるように添加した生理食塩液に分散した注射剤又は点滴剤がより好ましい。投与方法としては、静脈への点滴又は静脈、動脈、局所等への注射が好ましい。投与する液量は、投与方法、投与する場所等により異なるが、50~500ccとするのが好ましく、この液量に前記の量の細胞が含まれるようにするのが好ましい。投与頻度は1回/日~1回/月とするのが好ましく、投与回数

は少なくとも1回、好ましくは5回以上である。

【0030】

【実施例】

実施例1

(1) 抗CD3抗体固相化培養フラスコの調製

抗CD3抗体（OKT3、オルソ ファーマシューティカル コーポレーション製）をリン酸緩衝食塩水溶液（PBS）で5 $\mu$ g/mlの濃度に希釈し、表面積25cm<sup>2</sup>のフラスコに5ml注入した。この溶液をフラスコの底面にまんべんなく広げ、冷蔵庫（4℃）で一晩以上、使用時まで静置した。溶液を注入したフラスコは、使用前に4℃のPBSで3回洗浄した。

【0031】(2) 末梢血からのリンパ球の分離

ヘパリン処理をした20mlの注射器を用いて採血したヒト末梢血全血20mlに生理食塩液20mlを加え2倍に希釈し、密度勾配遠心分離の媒体であるFicoll-Paque（ファルマシア社製）4mlに希釈血液10mlを重ねて350 $\times$ G、25分、20℃の条件で遠心を行いリンパ球層を回収し、RPMI-1640培地で3回洗浄した。約 $2 \times 10^7$ 個のリンパ球が得られた。

【0032】(3) CD16陽性細胞の除去

マウス抗CD16抗体（濃度200 $\mu$ g/ml、オンコジーン・サイエンス社製）0.07mlと冷却したPBSで洗浄したヒツジ抗マウスIgG標識磁気ビーズ0.3ml（ $10^6$ 個ビーズ、ダイナール社製）を2時間水中に静置させ、抗CD16抗体を磁気ビーズに結合させた。3回冷却したPBSにて洗浄の後、10%（体積/体積）不活化ヒト正常血清含有RPMI-1640培地0.5mlに浮遊させた分離リンパ球と混合し、必要に応じ軽く攪拌しながら2時間水中に静置させた。抗CD16抗体結合磁気ビーズと結合したCD16陽性細胞は、磁石により除去し、磁気ビーズ非結合のリンパ球を回収し培養用とした。

【0033】(4) IL-2を含む培養液（培地）の調整

RPMI-1640培地（シグマ社製）に、10%（体積/体積）ヒト正常血清（新鮮凍結血清を37℃で解凍後、56℃、30分間加熱して不活化し、37,000 $\times$ G、60分、4℃の遠心により沈殿物を除去し、さらに0.22 $\mu$ mのフィルターで濾過したもの）、100U/mlペニシリン（萬有製薬株式会社製）、100 $\gamma$ /mlストレプトマイシン（明治製薬株式会社製）及びIL-2（テセロイキン、塩野義製薬株式会社製）700U/mlを含むように調整した。

【0034】(5) リンパ球の培養

CD16陽性細胞を除去したリンパ球は、IL-2 700U/mlを含む10%（体積/体積）ヒト正常血清含有RPMI-1640培地中に細胞密度約 $2 \times 10^6$ 個/mlで懸濁させ、この細胞懸濁液約5mlを抗CD3抗体固相化フラスコ中に入れて培養を開始した。翌日（培養1日目）からIL-2を含む培地を1ml添加し、この操作を培養4日目まで繰り返した。培養5日目に抗CD3抗体を固相化していない表面積75cm<sup>2</sup>のフラスコに細胞浮遊液を移し、IL-2を含む培地を約10ml添加した。これ以後、フラスコ1本当たりの細胞浮遊液の量は約30mlを目安とし、培養液のオレンジ色から黄色の変化、及び細胞数の増加（ $1 \sim 10 \times 10^6$ 個/mlを目安）に応じて新しいフラスコに基本的に2分割して本数を増やし、IL-2を含む培地を約10ml添加した。

【0035】(6) ガンマー・デルタT細胞の単離

固相化抗CD3抗体及びIL-2により増殖させたリンパ球を回収し、まず2mlのマウス抗CD4<sup>+</sup>磁気ビーズ、続いて2mlのマウス抗CD8<sup>+</sup>磁気ビーズ（いずれもダイナール社製）とそれぞれ30分間水中で混合し、各磁気ビーズに結合したCD4陽性及びCD8陽性細胞を磁石で除去した。適時FACSscan（ベクトン・ディッキンソン社製）でガンマー・デルタT細胞の精製度を確認した。この除去操作を2回繰り返し、精製度95%以上とした。また、培養により1.5%まで増殖してきたCD16陽性細胞は、リンパ球からの除去と同じ方

法で除去した。

【0036】(7) 培養リンパ球の表現型の測定  
上記により得られた培養リンパ5×10<sup>5</sup>個を試験管に分取し、RPMI-1640培地を加え1回遠心後上清を除去して、直接染色の場合FITC（フルオレセインイソチオシアネート）またはPE（フィコエリスリン）標識モノクローナル抗体10μlを、間接染色の場合非標識モノクローナル抗体1μgをそれぞれ加え良く攪拌した。水中で30分間静置の後、RPMI-1640培地で2回遠心洗浄した。間接染色の場合、次に適当に希釈したFITC標識ヒツジ抗マウス抗体又は抗ラット抗体（カッペル社製）10μlを加え水中で30分間静置の後、RPMI-1640培地で2回遠心洗浄した。最後に0.5mlのRPMI-1640培地を加え、良く攪拌し、FACScan（ベクトン・デッキンソン社）で各抗体に反応した表面抗原を測定した。

【0037】測定に用いたモノクローナル抗体は、直接染色には、FITC標識抗CD3抗体、FITC標識抗CD16抗体、FITC標識抗TCR-α/β抗体、FITC標識抗TCR-γ/δ抗体、FITC標識抗CD4+PE標識抗CD8抗体、PE標識抗CD56抗体（以上ベクトン・デッキンソン社製）、間接染色には、ラット抗IL-2受容体α鎖抗体（抗CD25、セロテック社製）、マウス抗IL-2受容体β鎖抗体（Mik-β1、ニチレイ（株）製）、マウス抗IL-2受容体γ鎖抗体（AG184、ファーマンジェン社製）及びマウス抗IL-12受容体β1抗体（ホフマン・ラ・ロッシュ社製）及びFITC標識抗ラットIgG又はFITC標識抗マウスIgG（以上カッペル社製）を用いた。結果を表1に示す。

【0038】

【表1】

表 1

	陽性率 (%)
TCR-ガンマー・デルタ鎖	97.5
CD16	1.5
CD3	98.3
CD2	99.0
CD56	42.7
IL-2受容体α鎖	64.4
IL-2受容体β鎖	13.4
IL-2受容体γ鎖	96.6
IL-12受容体β1鎖	87.2

【0039】この測定結果から、ガンマー・デルタT細胞は97.5%の高純度で含まれ、また、その他の表現型はCD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>であることが分かった。また、得られたガンマー・デルタT細胞は標的細胞の認識に重要な接着分子であるCD56が約

50%発現していた。さらに、単離したガンマー・デルタT細胞は、IL-2受容体α、β、γ鎖に加えIL-12受容体を87.2%という高い割合で発現しており、このことは、ガンマー・デルタT細胞がIL-2以外にIL-12によっても活性化されることが示された。よって、IL-2とIL-12との相加または相乗効果が期待され、さらに、IL-2受容体の一部を供用をしているIL-4、IL-7、IL-9によっても活性化される可能性も示唆された。

10 【0040】(8) 細胞増殖活性の測定

単離ガンマー・デルタT細胞を各濃度のIL-2を含む10%（体積/体積）ヒト血清加RPMI-1640培地に浮遊させ、1×10<sup>5</sup>個/200μlを96穴平底プレート（ファルコン社製）に播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で72時間培養した。培養終了6時間前に3H-thymidine（ICN社製）0.5μCi/20μlを添加し、セル・ハーベスター（ベクトル社）で細胞をガラス濾紙上に回収し、液体シンチレーション・カウンター（ワラック社）でガラス濾紙上の細胞の放射活性を測定した。結果を図1に示す。図1に示されるように、得られたガンマー・デルタT細胞はIL-2によって濃度依存的に増殖活性が増強された。

【0041】(9) 培養腫瘍細胞に対する障害活性の測定

効果細胞として単離ガンマー・デルタT細胞2×10<sup>5</sup>個を各濃度のIL-2を含む10%（体積/体積）ヒト血清加RPMI-1640培地に浮遊させ、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で24時間培養した。細胞は、10%（体積/体積）牛胎児血清（FBS）添加RPMI-1640培地で3回洗浄し、同じ培地に浮遊させ、細胞数を数えた後96穴U底プレート（ファルコン社製）の最上段に200μlづつ播種し、以下2段目以降2倍づつ希釈して希釈段階を作製した。続いて、<sup>51</sup>Cr（ICN社製）を2時間標識した標的細胞（自己腫瘍細胞、自己新鮮末梢血リンパ球及びIL-2刺激自己末梢血リンパ球）1×10<sup>5</sup>個/mlを100μl（1×10<sup>4</sup>個）づつ播種してガンマー・デルタT細胞と混合し、プレートを350×Gで、5分間遠心した後、5%CO<sub>2</sub>、37℃で4時間培養した。ここでいう自己腫瘍細胞とは、リンパ球を採取したと同じ患者由来の腫瘍細胞、自己新鮮末梢血リンパ球とは、リンパ球を採取したと同じ患者由来の分離直後のリンパ球、IL-2刺激自己末梢血リンパ球とは、リンパ球を採取したと同じ患者由来のリンパ球をIL-2 700U/ml単独で3日間刺激したものをいう。培養終了後、上清100μlを採取し、ガンマー・カウンター（バックード社製）で遊離した<sup>51</sup>Crの放射活性（cpm、試験遊離群）を測定した。細胞障害率（%）は、以下の式で算出した。

【0042】

【数1】



$$\text{細胞障害率 (\%)} = \frac{\text{試験遊離群(cpm)} - \text{自然遊離群(cpm)}}{\text{最大遊離群(cpm)} - \text{自然遊離群(cpm)}} \times 100$$

なお、 $^{51}\text{Cr}$ 標識腫瘍細胞に3%トリトンX-100を加え細胞を溶解したものを最大遊離群、 $^{51}\text{Cr}$ 標識腫瘍細胞単独を自然遊離群とした。結果を図2に示す。

【0043】図2～図4に示したように自己腫瘍細胞を標的細胞にした場合、IL-2の濃度依存的に明らかに細胞障害活性は増強される。しかし、新鮮自己リンパ球及びIL-2刺激自己リンパ球に対しては、IL-2の濃度を増やしても全く障害しない。従って、本方法により単離したガンマー・デルタT細胞は、癌細胞を特異的に標的にすることが明らかとなり、このことは、ガンマー・デルタT細胞が養子免疫療法に用いる免疫治療剤の

有効成分とするための効果的な細胞であることを示すものである。

#### 【0044】比較例

比較例として、予めCD16陽性細胞を除去しない場合について、同様に操作して増殖リンパ球を得た。表2に、予めCD16陽性細胞を除去した場合（実施例1）としない場合（比較例）での、培養14日後のリンパ球集団に含まれるCD16陽性細胞の陽性率を示す。

#### 【0045】

#### 【表2】

表 2

	分離直後	培養14日後
全リンパ球	17.6	33.8
CD16陽性細胞除去リンパ球	1.0未満	1.5

表2の結果から示されるように、予めCD16陽性細胞を除去して増殖させたリンパ球集団には、CD16陽性細胞は1.5%含まれていたにすぎないが、除去せずに増殖した場合は、33.8%まで増殖していた。

#### 【0046】実施例2

免疫治療剤及びその使用方法を次に具体的に示す。

#### (1) 免疫治療剤

上記の方法で癌患者由来のガンマー・デルタT細胞を製造し、これを市販の分離剤（Lymphoprep, Nycomed社製）を用いて、そのプロトコルに従って分離精製する。得られる細胞 $2 \times 10^6$ 個を、ヒト血清アルブミン0.1%を含む生理食塩液200mlに懸濁して、点滴剤形態の免疫治療剤とすることができる。

#### (2) 免疫治療剤の使用法

上記注射剤の全量を、癌患者に点滴静注する。この操作を月1回の割合で繰り返すことにより、癌患者の癌を治癒したり、症状の進行の停止又は鈍化を図ることができる。

#### 【0047】

【発明の効果】請求項1及び2記載の発明は、ガンマー

・デルタT細胞を簡便に効率よく製造することができるものである。請求項3記載の発明は、効果細胞として有力なガンマー・デルタT細胞を含む免疫治療剤として、癌、各種感染症等に有効な養子免疫療法に用いることができ、高い治療効果が期待できるものである。

#### 【図面の簡単な説明】

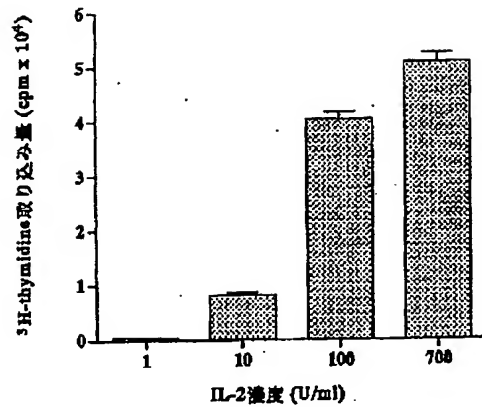
【図1】増殖リンパ球から単離したガンマー・デルタT細胞のIL-2刺激に対する増殖反応（Proliferation）を示したグラフである。

【図2】単離したガンマー・デルタT細胞（効果細胞）のIL-2刺激による自己腫瘍細胞（標的細胞）特異的障害活性（Cytotoxicity）を示したグラフである。

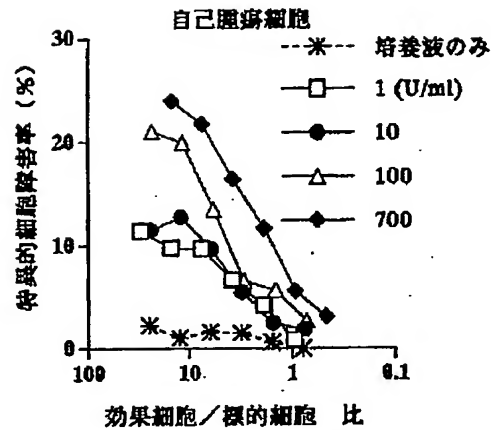
【図3】単離したガンマー・デルタT細胞（効果細胞）のIL-2刺激による新鮮自己抹消血リンパ球（標的細胞）特異的障害活性（Cytotoxicity）を示したグラフである。

【図4】単離したガンマー・デルタT細胞（効果細胞）のIL-2刺激によるIL-2刺激自己抹消血リンパ球（標的細胞）特異的障害活性（Cytotoxicity）を示したグラフである。

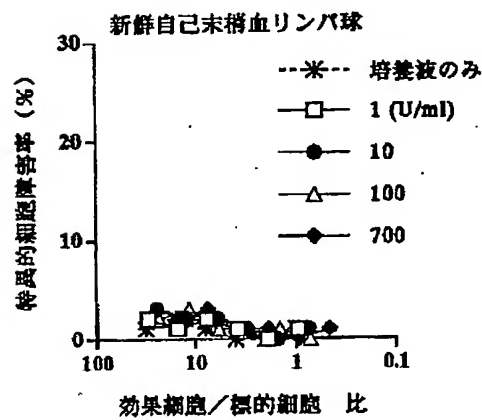
【図1】



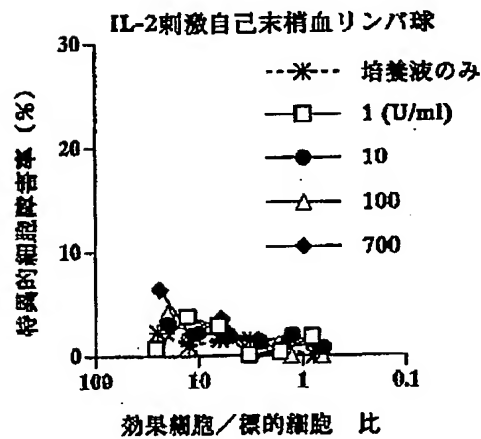
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

- (71)出願人 597056729  
片倉 隆一  
宮城県仙台市太白区長町南二丁目9番20号
- (71)出願人 597056730  
横山 純吉  
宮城県仙台市青葉区柏木二丁目3番7号  
朝日プラザ柏木319
- (71)出願人 597056741  
吉本 高志  
宮城県仙台市青葉区角五郎一丁目12番2号
- (72)発明者 山口 智宏  
茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化成工業株式会社医薬品研究所内

- (72)発明者 藤宮 芳章  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目7番28号  
住友林業株式会社内
- (72)発明者 海老名 卓三郎  
宮城県仙台市青葉区広瀬町二丁目12番地
- (72)発明者 鈴木 洋一  
宮城県仙台市宮城野区原町五丁目9番6号
- (72)発明者 片倉 隆一  
宮城県仙台市太白区長町南二丁目9番20号
- (72)発明者 横山 純吉  
宮城県仙台市青葉区柏木二丁目3番7号  
朝日プラザ柏木319
- (72)発明者 吉本 高志  
宮城県仙台市青葉区角五郎一丁目12番2号